

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 10081607
PUBLICATION DATE : 31-03-98

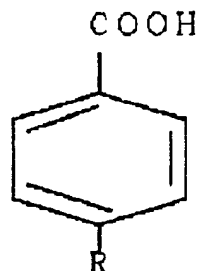
APPLICATION DATE : 06-09-96
APPLICATION NUMBER : 08236374

APPLICANT : KAMIYAMA:KK;

INVENTOR : KAMIYAMA HIROSHI;

INT.CL. : A01N 37/40 A01N 37/10 A23L 3/3508

TITLE : ANTIMICROBIAL AGENT



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antimicrobial agent, having excellent antimicrobial activities and high safety and capable of protecting foods, beverages, medicines, cosmetics, etc., from contamination with microorganisms and useful for preserving the foods, beverages, medicines, cosmetics, etc., by using specific benzoic acids substituted at the p-position as an active ingredient.

SOLUTION: This antimicrobial agent is prepared by using a compound represented by the formula (R is an electron donative group) or its salt. For example, 4-methoxybenzoic acid, 4-ethoxybenzoic acid and 4-propoxybenzoic acid are cited as the compound represented by the formula. The 4-substituted benzoic acid represented by the formula or its salt has a low toxicity and the compound derived from a natural product is harmless to humans. The compound represented by the formula or its salt may be used along or as a mixture thereof. The effective concentration of the compound represented by the formula is usually about $\leq 1.2\text{mM}$, preferably about $\leq 4\text{mM}$. Furthermore, the compound represented by the formula can be used with other well-known antimicrobial agents in combination.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-81607

(43)公開日 平成10年(1998) 3月31日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 N	37/40		A 0 1 N	37/40
	37/10			37/10
A 2 3 L	3/3508		A 2 3 L	3/3508

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 7 頁)

(21)出願番号	特願平8-236374	(71)出願人	596131481 株式会社カミヤマ 東京都大田区仲池上2丁目18番3号
(22)出願日	平成8年(1996)9月6日	(72)発明者	神山 弘 東京都大田区仲池上2丁目18番3号 株式 会社カミヤマ内
		(74)代理人	弁理士 北村 欣一 (外2名)

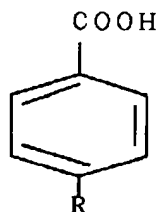
(54)【発明の名称】 抗菌剤

(57)【要約】

【課題】 優れた抗菌作用と高い安全性とを有する抗菌剤の提供。

【解決手段】 次の一般式：

【化3】

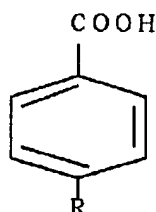


(上式においてRはメトキシ基またはイソプロピル基である)を有する化合物またはその塩からなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式：

【化1】



(上式においてRは電子供与基である。)を有する化合物またはその塩からなる抗菌剤。

【請求項2】 前記電子供与基がアルコキシ基またはアルキル基である請求項1記載の抗菌剤。

【請求項3】 前記電子供与基がメトキシ基またはイソプロピル基である請求項1記載の抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品、飲物、薬剤および化粧品等を微生物による汚染から防ぎ、抗菌生物的に保存するための抗菌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、食品、飲物、薬剤および化粧品等の分野における抗菌剤として、p-ヒドロキシ安息香酸エステルが知られている。一般的には、メチルエステルおよびプロピルエステルが使用されているが、ブチルエステルおよびベンジルエステルもまた使用されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】これらのp-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステルおよびプロピルエステルは、ヒトの口に入るまたはヒトの皮膚・粘膜に接触する食品や他の製品に使用することが許されているが、これらのエステル単独では口に入る制酸剤のようなものを含む製品等を保存するには不適切であること、また、これらのエステルは味が良くないことが知られている。そのために、これらのエステルとシンナムアルデヒドとを組み合わせるにより、これらの欠点を改良しようとする試みがなされているが(特表昭60-501210号)、単独の化合物では、満足すべき効果と安全性を兼ね備えたものは未だ得られていない。

【0004】本発明は、かかる技術的課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、優れた抗菌作用と高い安全性とを有する抗菌剤を提供することにある。

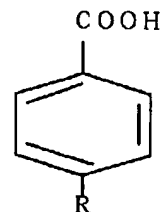
【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、前記従来技術の課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、ある種のpara位置換安息香酸類に抗菌作用があることを発見し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明において、請求項1記載の抗菌剤は、次の一般式：

【0007】

【化2】



【0008】(上式においてRは電子供与基である。)を有する化合物またはその塩からなることを特徴とする。

【0009】また、本発明において、請求項2記載の抗菌剤は、請求項1記載の抗菌剤における電子供与基がアルコキシ基またはアルキル基であることを特徴とする。さらに、本発明において、請求項3記載の抗菌剤は、請求項1記載の抗菌剤における電子供与基がメトキシ基またはイソプロピル基であることを特徴とする。

【0010】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態として、その構成を詳細に説明する。

【0011】本発明の抗菌剤としての4-置換安息香酸は、既知の物質であり、例えば、4-メトキシ安息香酸は、ピムピネラ アニサム(Pimpinella anisum)の種子由来のいわゆるアニス酸であり、工業的には、例えば、英国特許第798,619号および第842,998号ならびに特開平1-316342号公報に記載されている方法で容易に合成することができる。

【0012】本発明における4-置換安息香酸は、安息香酸の4位の水素原子が電子供与基、例えば、アルコキシ基またはアルキル基で置換されたものである。置換基としてのアルコキシ基には、好ましくはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基等が包含され、特に好ましくはメトキシ基である。また、アルキル基には、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基等が包含され、特に好ましくは、イソプロピル基である。

【0013】上記化合物の具体例としては、例えば、4-メトキシ安息香酸、4-エトキシ安息香酸、4-プロポキシ安息香酸、4-イソプロポキシ安息香酸、4-ブトキシ安息香酸、および4-イソブトキシ安息香酸；ならびに4-メチル安息香酸、4-エチル安息香酸、4-プロピル安息香酸、4-イソプロピル安息香酸、4-ブチル安息香酸、および4-イソブチル安息香酸等が挙げられる。

【0014】前記4-置換安息香酸は、既知の方法によって塩にすることができ、使用する目的によって塩の形で用いてもよい。そのような塩としては、特に限定はされないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩の他、アンモニウム塩、アミノ酸塩等の塩が挙げられ

る。

【0015】前記したような4-置換安息香酸またはその塩は既知物質ではあるが、その抗菌作用については全く知られておらず、本発明者によって初めて明らかにされたものである。

【0016】本発明における4-置換安息香酸またはその塩は、低毒性であり、抗菌作用を有することから、また、天然物由来のヒトに害のない化合物であることから、食品、飲物、薬剤および化粧品等のための抗菌剤成分として有効である。

【0017】上記4-置換安息香酸またはその塩は、単独で、また、混合物として使用してもよい。この化合物の有効濃度は、一般に、約1.2mM以上であり、好ましくは、約4mM以上である。抗菌作用の観点からは、上限濃度に制限はない。さらに、この化合物は他の既知の抗菌剤と併用することもできる。

【0018】本発明の4-置換安息香酸の最大許容用量は、4-メトキシ安息香酸および4-イソプロピル安息香酸の場合、経口および腹腔内の両方において、 $\geq 300\text{mg}/\text{kg}$ （試験動物：ICR 20g 雄マウス、経口および腹腔内共にそれぞれ3匹使用。300mg/kgの投与で4日間死亡ゼロ。）であった。

【0019】

【実施例】以下、実施例および使用例により本発明の構成を具体的に説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

【0020】（実施例1）4-メトキシ安息香酸、4-イソプロピル安息香酸および対照の物質のインビトロ抗菌性について、メチシリン耐性スタフィロコッカス オウレウス (*S. aureus* Methicillin Resistnat) (ATCC3359

1)、エシェリッチア コリ (*E. coli*) (ATCC10536)、マイコバクテリウム ラナエ (*M. ranae*) (ATCC110)、シュードモナスアエルギノサ (*Ps. aeruginosa*) (ATCC9027)、クレブシエラ ニュウモニアエ (*K. pneumoniae*) (A9977)、プロテウス ヴァルガリス (*P. vulgaris*) (A9539) のような細菌類、ならびに、カンジダ アルビカンズ (*C. albicans*) (ATCC10231)、トリコフィトン メンタグロフィテス (*T. mentagrophytes*) (CDC アトランタ)、トリコモナスホエタス (*Trichomonas foetus*) (Br. M. 菌株) のような菌類および原生動物に対し、以下試験した。

【0021】試験方法A（ブイヨンマクロ希釈、48ケのウエルプレート中、細菌類に対する抗菌性試験）：以下の表1記載の試験化合物1mgを100%DMSOの0.1ml中に溶解し、0.1mlの滅菌水で希釈して、50%DMSO中5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の試験原液を作成した。次いで、この試験原液0.1mlをとって、0.1mlの50%DMSO中に加え、2倍希釈液を作った。上記溶液のそれぞれから20 μl 宛を取り出し、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 \text{CFU}/\text{ml}$ の適当な細胞量を有するブイヨン培地0.98mlを含む試験用ウエルに加えた。かくして、最終容量が1mlであり、DMSOの最終最大濃度が1%である試験液が得られた。初めの試験溶液は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0022】次いで、目視でまたは顕微鏡で試験液の濁度を観察することにより、微生物の生育を観測し、MIC（最小抑制濃度）（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を決定した。その結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

細菌類に対して：

微生物 試験化合物	スタフィロコッカス オウレウス (メチシリン耐性: ATCC33591)	エシェリチア コリ (ATCC10536)	マイコバクテリウム ラウエ (ATCC110)
4-メトキシ安息香酸	800	800	>800
4-イソプロピル安息香酸	400	>800	>800
ヒヒカル对照 (0.5%DMSO)	+	+	+
ブランク对照 (微生物不存在)	-	-	-
ゲンタマイシン	0.3	0.3	0.3
	シェクトモナス アエルキナ (ATCC9027)	クレブシエラ ニュウモニエ (A9977)	プロテウス ウェルカリス (A9539)
	800	800	800
	>800	800	400
	+	+	+
	-	-	-
	1	0.1	0.3

(注)

+ : 微生物の生育あり。

- : 微生物の生育なし。

【0024】試験方法B（ブイヨンマクロ希釈、96ケのウエルプレート中、菌類および原生動物に対する抗菌性試験）：以下の表2記載の試験化合物1mgを100%DMSOの0.1ml中に溶解し、0.9mlの滅菌水で希釈して、10%DMSO中10000μg/ml濃度の試験原液を作成した。次いで、この試験原液0.1mlをとって、0.1mlの10%DMSO中に加え、2倍希釈液を作った。上記溶液のそれぞれから20μl宛を取り出し、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mlの適当な細胞量を有するブイヨン培地180μlを含む試験

用ウエルに加えた。かくして、最終容量が200μlであり、DMSOの最終濃度が1%である試験液が得られた。初めの試験溶液は100μg/mlであった。

【0025】次いで、目視で試験液の濁度を観察し、または、分光光度計で光学密度を観察することにより、微生物の生育を観測し、MIC (μg/ml) を決定した。その結果を表2に示す。

【0026】

【表2】

菌類および原生動物に対して：

試験化合物 \ 微生物	カンジダ アルビカンス (ATCC10231)	トリコフィトン メンタグロフィテス (CDC フトランタ)	トリコモナス ネイタス (Br. N. 菌株)
4-メトキシ安息香酸	400	400	>800
4-イソプロピル安息香酸	200	200	800
ヒビタム对照 (0.5%DMSO)	+	+	+
フランク对照 (微生物不存在)	-	-	-
アソナリシン B	0.03	0.3	--
メトロニダゾール	--	--	0.3

(注)

- + : 微生物の生育あり
 - : 微生物の生育なし
 -- : 測定不能。

【0027】上記表1および2から明らかなように、4-アルコキシ安息香酸および4-イソプロピル安息香酸ともに、細菌類、菌類および原生動物に対して優れた抗菌作用を示した。

【0028】なお、上記4-メトキシ安息香酸および4-イソプロピル安息香酸のナトリウム塩、カリウム塩カルシウム塩等も上記実施例の場合と同様に優れた抗菌作用を有する。

【0029】(使用例1) 4-メトキシ安息香酸の抗菌作用が上記したように優れていることから、実際にこの化合物をミルクに添加して、ミルクの酸敗試験を、対照の物質と共に以下行った。通常、ミルクの酸敗を調べるには、酸性化、ケーキング、細菌数算定等のような方法があるが、本試験では、ケーキングおよび細菌数の算定を行った。低温殺菌されたミルクおよび殺菌されたスキムミルクを用いて、低温殺菌されたミルク中で自発酸敗を行い、また、殺菌されたスキムミルク中に5.0×1

0³CFU/ml(最終濃度)のE. coliの接種を行った。酸性化については本試験ではpHを測定したに過ぎず、試験物質の溶液が充分酸性(使用した濃度に依存して、pH=5.5~6.5)であったので、酸敗のための判断結果としては採用しなかった。

【0030】試験方法A(低温殺菌されたミルクの自発酸敗試験)：100%DMSO中に溶解した試験物質の2倍希釈液を、低温殺菌したミルク中に、ミルク1.98mlに対して0.02mlの容量で添加し、最終濃度1%DMSOを得た。その後すぐに、試験化合物を添加し、37℃での48時間のインキュベーション後、pH値、ミルクのケーキングの出現の有無および細菌数(CFU/ml)がミルクの酸敗の指標として観測された。得られた結果を、表3に示す。

【0031】

【表3】

試験項目 試験化合物(濃度)	pH 値		ケーキング*		CFU/ml	
	0時間	48時間, 37℃	0時間	48時間, 37℃	0時間	48時間, 37℃
ヒトヒタル素(1%DMISO)						
: 20μl/ml	6.72	4.81	-	+	1.2×10^3	5.2×10^6
フーラン素 : 0	6.72	4.81	-	+	1.2×10^3	5.2×10^6
4-メトキシ安息香酸:						
5000μg/ml	5.52	5.52	-	-	1.2×10^3	0
2500μg/ml	5.91	5.95	-	-	1.2×10^3	0
1000μg/ml	6.32	6.09	-	-	1.2×10^3	2.5×10^6
500μg/ml	6.49	5.24	-	+	1.2×10^3	6.1×10^7
250μg/ml	6.56	4.69	-	+	1.2×10^3	3.2×10^8
ベンゾイルアミノ酸:						
5μl/ml	6.71	6.68	-	-	1.2×10^3	2.9×10^2
2.5μl/ml	6.71	5.19	-	+	1.2×10^3	5.6×10^7

(注)

+ : ケーキング出現

- : 正常

【0032】試験方法B(殺菌されたスキムミルクへの
 5.0×10^3 のE. coliの接種): 殺菌された
 (121℃、5分間)スキムミルクに、ミルクの酸敗を
 促進せしめるために、最終濃度 5.0×10^3 CFU/
 mlのE. coli ATCC 10536を添加し
 た。そして、試験物質の2倍希釈液を、E. coli/

スキムミルク混合物中に添加した。37℃での48時間
 インキュベーションによりpH値、ケーキングの出現の
 有無および細菌数がミルク酸敗の指標として観測され
 た。得られた結果を表4に示す。

【0033】

【表4】

試験項目 試験化合物(濃度)	pH 値		ケーキング*		CFU/ml	
	0時間	48時間, 37℃	0時間	48時間, 37℃	0時間	48時間, 37℃
ヒトヒタル菌(1%DMSO) : 20μl/ml	6.69	5.21	—	+	0	2.0×10^4
7°ラック菌 : 0 (E. coli不存在)	6.70	6.69	—	—	0	0
4-メトキシ安息香酸:						
5000μg/ml	5.46	5.41	—	—	0	0
2500μg/ml	5.72	5.64	—	—	0	6.0×10^4
1000μg/ml	6.25	6.00	—	—	0	4.6×10^7
500μg/ml	6.49	5.55	—	—	0	1.0×10^8
250μg/ml	6.56	5.36	—	+	0	1.9×10^8
ベンジルアルコール:						
5 μl/ml	6.70	6.68	—	—	0	2.0×10^4
2.5μl/ml	6.70	5.80	—	—	0	7.0×10^4
アゾビシリン:						
3 μg/ml	6.70	6.70	—	—	0	0
1 μg/ml	6.70	6.49	—	—	0	3.8×10^4
0.3μg/ml	6.70	5.60	—	+	0	1.0×10^7

(注)

+ : ケーキング出現

— : 正常

【0034】上記表3及び4から明らかなように、4-アルコキシ安息香酸は、ミルクの酸敗に対して優れた抵抗作用を示す。

【0035】

【発明の効果】本発明の4-置換安息香酸からなる抗菌

剤は、細菌類、菌類および原生動物等の微生物に対して優れた抗菌作用があり、また、高い安全性を有する。そのため、本発明の抗菌剤の使用により、食品、飲物、薬剤および化粧品等のようなヒトの口に入る天然物ならびに生産物を効果的に保存ことができる。